

Enzymatische Bildung von L-Methionyl-L-methionin aus L-Methionin

Verkürzte Fassung der

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde, vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

ADOLF VETTERLI
aus Wagenhausen (Thurgau)

Basel
Buchdruckerei Birkhäuser AG.
1957

Enzymatische Bildung von L-Methionyl-L-methionin aus L-Methionin

Verkürzte Fassung der

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde, vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

ADOLF VETTERLI

aus Wagenhausen (Thurgau)



Basel

Buchdruckerei Birkhäuser AG.

1957

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. *M. Brenner* und Dr. *T. Reichstein*.

Basel, den 15. Februar 1955.

Prof. Dr. *L. Vonderschmitt*
Dekan.

Herrn *Adolf Vetterli* wurde von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel am 23. Februar 1955 erlaubt, diese verkürzte Fassung seiner am 23. Februar 1955 genehmigten Inauguraldissertation drucken zu lassen. Die vollinhaltliche Arbeit mit dem Titel:

„Über die Synthese von D-Methionyl-D-methionin und
L-Methionyl-L-methionin durch Leberfermente“

kann eingesehen oder entliehen werden:

1. in der Organ.-Chem. Anstalt der Universität Basel;
2. in der Universitätsbibliothek Basel;
3. in der Schweizerischen Landesbibliothek in Bern.

Enzymatische Peptidsynthese.

6. Mitteilung¹⁾).

Enzymatische Bildung von L-Methionyl-L-methionin aus L-Methionin²⁾

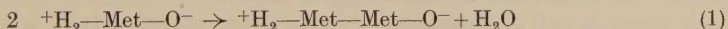
Das Gleichgewicht zwischen einem Dipeptid und den zugehörigen Aminosäuren liegt so stark auf der Seite der Aminosäuren, dass in einem System aus Aminosäure, Peptid, Katalysator und Wasser ein direkter Nachweis des Peptids mit einfachen Mitteln im allgemeinen nicht zu erbringen ist.

Wir berichten im folgenden über eine Ausnahme von dieser Regel.

Homogenate von Ratten- oder Schweineleber enthalten eine Dipeptidase, welche im neutralen oder schwach alkalischen pH-Bereich (pH 6 bis 9) L-Methionyl-L-methionin in L-Methionin spaltet. Nun kann man aber bei pH 8 und 9 in Gegenwart hoher Methioninkonzentrationen papierchromatographisch eine Synthese des Dipeptids beobachten. Erniedrigung des pH auf 7 bringt das entstandene Peptid zum Verschwinden; geht man auf pH 8 bis 9 zurück, so tritt das Peptid von Neuem in Erscheinung. Einfache pH-Verschiebung bewirkt also eine leicht nachweisbare Synthese oder Hydrolyse von L-Methionyl-L-methionin.

Unter günstigen Umständen (vgl. unten) gehen 5 bis 10% des Methionins in Dipeptid über. Letzteres ist durch Chromatographie an einer Cellulose-Säule (Collidin/Wasser), anschliessende Verteilung zwischen Essigester/Wasser/Trichloressigsäure und nachfolgende Salzbildung mit 1-Nitronaphtalin-5-sulfonsäure isoliert worden. Das Salz und das freie Peptid stimmen in ihren physikalischen Eigenschaften mit authentischem Material überein.

Zusatz von Cyanid beeinflusst die Reaktion nicht. Die Synthese ist also unabhängig von irgendwelchen Atmungsvorgängen. Andererseits schliesst die Bedingung eines basischen Milieus aus, dass die Synthese allein auf einem Umsatz nach Gleichung (1) beruht.

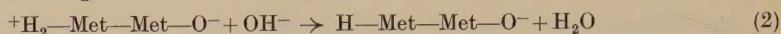


Es muss der Reaktion (1) eine Reaktion (2) überlagert sein, welche gebildetes zwitterionisches Dipeptid aus der Lösung entfernt. Hierbei

¹⁾ 5. Mitteilung: *M. Brenner, H. R. Müller & A. Vetterli*, *Helv.* **35**, 227 (1952).

²⁾ Diss. *A. Vetterli*, Basel 1955; vgl. ferner *M. Brenner & A. Vetterli*, II^e Congrès International de Biochemie, Paris 1952, Résumés des Communications, p. 27; III^e Congrès International de Biochemie, Bruxelles 1955, Résumés des Communications, p. 16.

handelt es sich, wie unsere Untersuchung ergeben hat, um den Übergang von zwitterionischem Dipeptid in das Peptid-Anion, d. h. um eine Salzbildung.



Bei einem beliebigen Methionylmethionin/Methionin-Gemisch setzt sich schon in schwach basischem Medium die analytische Gesamtkonzentration an Methionylmethionin (isoelektrische Zone pH 5,2 bis 5,5) aus einem zwitterionischen und einem beträchtlichen anionischen Anteil zusammen. Gleichzeitig liegt die schwächer saure Aminosäure (isoelektrische Zone pH 4,3 bis 7,2) überwiegend in zwitterionischer Form vor.

Zu einer quantitativen Aussage über den Einfluss der Acidität auf das Gleichgewicht im System Methionylmethionin/Methionin gelangt man auf folgendem Wege: Zwischen den analytischen Gesamtkonzentrationen an Dipeptid und Aminosäure gilt für ein gegebenes pH die bekannte Beziehung $[DIP]/[AS][AS] = \text{konstant}$. Im isoelektrischen pH-Bereich der beteiligten Stoffe ist der Zahlenwert der Konstanten wahrscheinlich von der Grössenordnung 10^{-3} . Das durch diesen Zahlenwert — wir wollen ihn mit K bezeichnen — definierte Gleichgewicht ist im wesentlichen ein Gleichgewicht zwischen zwitterionischem Dipeptid und zwitterionischer Aminosäure. Es gilt also:

$$[+DIP^-]/[+AS^-][+AS^-] = K. \quad (3)$$

Die analytischen Gesamtkonzentrationen $[DIP]$ und $[AS]$ dürfen nur dann in (3) eingeführt werden, wenn das Peptid und die Aminosäure vorwiegend in zwitterionischer Form vorliegen. Wo neben Zwitterionen Anionen oder Kationen auftreten, sind in (3) anstelle der analytischen Gesamtkonzentrationen die jeweiligen wahren Konzentrationen an isoelektrischen Formen einzusetzen. Dieses Vorgehen wäre indessen umständlich. Praktisch ist es einfacher und nützlicher, immer mit den analytischen Gesamtkonzentrationen zu operieren und dafür die Beziehung (3) durch eine korrigierte Beziehung (4)

$$[DIP]/[AS][AS] = K \cdot I \quad (4)$$

zu ersetzen. Hierbei ist K die Konstante aus (3) und I ein vom pH abhängiger Faktor. *Borsook*³⁾ hat den Faktor I als Ionisationsterm bezeichnet und dafür eine Bestimmungsgleichung abgeleitet, die sich in unserem Falle, wo die beiden Aminosäuren identisch sind, in folgende vereinfachte Form bringen lässt:

$$I = \frac{(k_1^M)^2 \cdot [H^+]}{k_1^D} \cdot \frac{[H^+]^2 + k_1^D \cdot [H^+] + k_1^D \cdot k_2^D}{([H^+] + k_1^M \cdot [H^+] + k_1^M \cdot k_2^M)^2} \quad 4).$$

³⁾ H. *Borsook*, Adv. Prot. Chem. **8**, 127 (1953).

⁴⁾ k_1^M, k_2^M = Dissoziationskonstanten von Methionin.

k_1^D, k_2^D = Dissoziationskonstanten von Methionylmethionin.

Aus Tab. 1 ist ersichtlich, dass der Ionisationsterm in unserem System bei pH 6 und 7 erwartungsgemäss praktisch gleich eins ist, dass er dann aber rasch ansteigt und bei pH 9 den sehr hohen Wert 11,8 erreicht

Tabelle 1.

Ionisationsterm I als Funktion vom pH im System Methionylmethionin/Methionin.

$$\text{Methionylmethionin } k_1 = 6,3 \cdot 10^{-4}, k_2 = 3,0 \cdot 10^{-8}$$

$$\text{Methionin } k_1 = 5,3 \cdot 10^{-3}, k_2 = 6,2 \cdot 10^{-10}.$$

pH	6,0	7,0	8,0	9,0	9,2	10,0	11,0
I	1,03	1,28	3,55	11,80	12,30*)	5,75	0,75

*) Maximalwert.

Ein Vergleich mit Tab. 2 lässt unser System tatsächlich als einen Ausnahmefall erkennen. Das Gleichgewicht zwischen den analytischen Gesamtkonzentrationen an Dipeptid und Aminosäure wird im System Methionylmethionin/Methionin durch pH-Verschiebungen aussergewöhnlich stark beeinflusst.

Tabelle 2³⁾.

Ionisationsterme I im System Alanyl-glycin/Alanin + Glycin.

pH	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0
I	1,00	1,00	1,01	3,57	6,21	1,47

Die Menge Methionylmethionin, welche sich unter gegebenen Bedingungen (Methioninkonzentration, pH) theoretisch bilden kann, liesse sich auf Grund der Ionisationsterme berechnen, wenn die Gleichgewichtskonstante

$$K = [\text{Methionylmethionin}]/[\text{Methionin}]^2$$

exakt bekannt wäre. Leider sind wir hier auf eine Schätzung angewiesen. K liegt mit einiger Wahrscheinlichkeit zwischen $6 \cdot 10^{-3}$ und $1 \cdot 10^{-3}$, entsprechend einem Wert von $\Delta F_{298}^0 = +3000$ bis $+4000$ cal³⁾. Indem wir nun diese Grenzwerte für K, die in Tab. 1 enthaltenen I-Werte und unsere experimentell verwendete Methioninkonzentration ($c = 0,17$ -m.) in die Beziehung

$$[\text{Methionylmethionin}]/[\text{Methionin}]^2 = K \cdot I$$

einsetzen, erhalten wir für jedes pH eine theoretisch erreichbare Peptidkonzentration (Tab. 3), die sich mit den experimentell erzielten Konzentrationen vergleichen lässt (Tab. 4). Die Zahlen der Tab. 3 sind Grenzwerte, deren Gültigkeit von der Zulässigkeit der getroffenen Annahmen abhängt. Sie sind trotzdem wertvoll, denn sie zeigen, dass synthetisiertes Peptid bei pH 6 und 7 papierchromatographisch kaum mehr in Erscheinung treten kann, weil die auftretenden Mengen unterhalb der Nachweisgrenze (0,5 bis 1 μg) liegen. Die für pH 8 und 9 berechneten Werte stimmen in der Grössenordnung mit dem experimentellen Befund (Tab. 4) überein.

Tabelle 3.

Theoretische Peptidausbeuten bei verschiedenen pH-Werten und $K = 6 \cdot 10^{-3}$ bzw. $1 \cdot 10^{-3}$;
 $c_{\text{Methionin}} = 0,17\text{-molar}$.

pH	Ausbeute					
	$K = 6 \cdot 10^{-3}$			$K = 1 \cdot 10^{-3}$		
	Mol/Liter	$\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$	%	Mol/Liter	$\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$	%
6,0	$1,79 \cdot 10^{-4}$	1,0	0,20	$0,30 \cdot 10^{-4}$	0,16	0,03
7,0	$2,22 \cdot 10^{-4}$	1,24	0,25	$0,37 \cdot 10^{-4}$	0,2	0,04
8,0	$6,15 \cdot 10^{-4}$	3,44	0,69	$1,02 \cdot 10^{-4}$	0,6	0,12
9,0	$20,4 \cdot 10^{-4}$	10,4	2,08	$3,4 \cdot 10^{-4}$	1,75	0,35

Tabelle 4.

Experimentelle Ausbeuten an Methionylmethionin bei verschiedenen pH-Werten. Methionin $c = 0,17\text{-m.}$, Glycylglycin/Collidin-Puffer $0,2\text{-m.}$, Fermentpräparat aus Schweineleber, 20°C. , Reaktionsabbruch nach 3 Std. durch Zusatz von $1/5$ Vol.-Teil 20-proz. Trichloressigsäure.

pH	6	7	8	9
Ausbeute $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}^{\text{a})}$	—	—	ca. 1	ca. 3
%	—	—	0,2	0,6
a) Die Bestimmung erfolgt papierchromatographisch.				

Die experimentelle Peptidausbeute bei pH 8 bis 9 beträgt nach Tab. 4 rund 0,5%. Von Interesse ist nun, dass man diese Ausbeute durch Erhöhung der Methioninkonzentration praktisch um einen Faktor 10 bis 20 steigern kann. Die erforderliche Konzentration lässt sich *de facto* erreichen, wenn man die üblich verwendete 0,17-m., Puffer- und Ferment-haltige⁵⁾ Methioninlösung ohne vorherigen Zusatz von Trichloressigsäure auf Filterpapier eindunsten lässt, wie dies bei der Papierchromatographie üblich ist. Dieser Befund ist eine Bestätigung der oft geäußerten Vermutung, wonach Reaktionen an Oberflächen nicht an die üblich festgestellten Löslichkeiten gebunden sind. Unter Zugrundelegung von $K = 6 \cdot 10^{-3}$ und einem Ionisationsterm von 3,5 (pH 8) entspricht eine auf dem Papier erzielbare Ausbeute von 25 μg Methionylmethionin aus 500 μg Methionin einer Methioninkonzentration von 1,3 Mol/Liter!

Ähnliche Konzentrationsverhältnisse lassen sich erreichen, wenn ein auf pH 8 gepuffertes Methionin-haltiges (0,17-m.) Leberhomogenat (1 Teil Leber, 5 Teile Carbonat-Puffer 0,1-m.) im Vakuumexsikkator eingetrocknet wird. Die erwähnte präparative Isolierung des Dipeptids ist von einer solchen Versuchsanordnung ausgehend durchgeführt worden.

⁵⁾ Frisches Leberhomogenat oder daraus abgetrennte Ferment-Fraktion (vgl. unten).

Die eingangs erwähnten Abbauversuche am Dipeptid des Methionins hatten gezeigt, dass die verantwortliche Dipeptidase über einen relativ breiten pH-Bereich aktiv sein musste. Quantitative Messungen der relativen Abbaugeschwindigkeit im Bereich von pH 6 bis 10 haben dies bestätigt. Die Reaktion verläuft im gesamten untersuchten Konzentrations- und pH-Bereich nach der nullten Ordnung. Figur 1 gibt die pH-Aktivitätskurve wieder. Die Reaktionsgeschwindigkeiten bei pH 7 und 9 sind danach ungefähr identisch. Im Syntheseversuch ist also die Ausbeutedifferenz beim Übergang von pH 7 auf 9 (Tab. 4) nicht die Folge eines Unterschiedes von Reaktionsgeschwindigkeiten. Sie ist bei hinreichender Fermentkonzentration in der Tat von der Versuchsdauer unabhängig. Diese Befunde decken sich mit unserer Auffassung, dass eine Gleichgewichtsreaktion vorliegt.

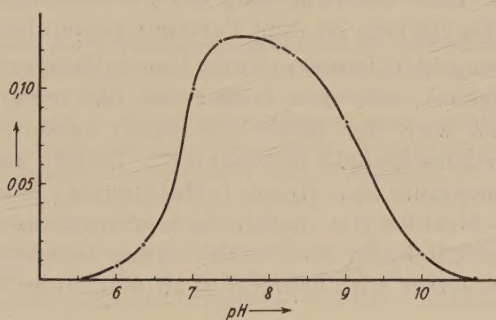


Fig. 1.

pH-Aktivitätskurve der Methionin-Dipeptidase.

Ordinate: Geschwindigkeitskonstante nullter Ordnung in willkürlichen Einheiten.

Abszisse: pH^{a)}.

a) Glycylglycin/Collidin-Puffer 0,2-m. + variable Mengen 1-n. HCl resp. 1-n. NaOH;
max. Pufferkapazität pH 6,5 bis 8,5.

Bei den erwähnten kinetischen Messungen haben wir zur Ermittlung des Reaktionsablaufes die Abnahme der analytischen Dipeptidkonzentration verfolgt. Hierzu ist das quantitative papierchromatographische Verfahren von Bode und Mitarb.⁶⁾ unseren speziellen Verhältnissen mit bestem Erfolg angepasst worden.

Es erwies sich im übrigen aus analysenteknischen Gründen als vorteilhaft, die Dipeptidase aus dem Leberhomogenat herauszufractionieren. Dies liess sich durch Ausfällen mit eiskaltem Aceton bei pH 6 (Citratpuffer), Auflösen in halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung und Dialyse in befriedigender Weise erreichen; Gefriertrocknung des Dialysates lieferte ein beschränkt haltbares, anfangs klar wasserlösliches Trockenpräparat.

⁶⁾ F. Bode, H. J. Hübener, H. Brückner & K. Hoeres, Naturwiss. **39**, 524 (1952).

Ein spezielles Problem bot die Pufferung. Im präparativen Versuch befriedigte die Verwendung von Soda/Hydrogencarbonat (pH 8 bis 9) vollauf. Im analytischen Versuch ergaben sich Schwierigkeiten infolge von Salzeffekten auf den Papierchromatogrammen; abgesehen davon ist Soda/Hydrogencarbonat bei pH 6 und 7 unbrauchbar. Demgegenüber besitzt eine wässrige Lösung von äquimolaren Mengen von technischem Collidin ($pK = 7,1$) und Glycylglycin ($pK = 8,1$) eine ausgezeichnete Pufferwirkung von pH 6,5 bis 8,5. Ihr pH ($c_{\text{Glycylglycin}} = c_{\text{Collidin}} = 0,2\text{-m.}$) liegt bei 7,6. Kleine Zusätze von 1-n. HCl oder 1-n. NaOH ergeben brauchbare Pufferlösungen von pH 6 bis 9; in unserem System war die Pufferung auch bei pH 10 noch völlig ausreichend, und zwar infolge minimaler Spaltung von Methionylmethionin während der ganzen Versuchsdauer. Störungen bei der Papierchromatographie traten nicht auf. Eine Beeinflussung der Fermentreaktion war nicht festzustellen; Glycylglycin ist dem Ferment gegenüber inert.

Unterwirft man den Isopropylester von L-Methionin der Wirkung von Leberhomogenat, wie dies früher für die D-Form beschrieben worden ist¹⁾⁷⁾, so wird der Ester sehr rasch verseift. Was man als endgültiges Versuchsergebnis beobachtet⁸⁾, beruht auf der oben beschriebenen Umsetzung des freien L-Methionins. Eine intermediäre Bildung von L-Methionyl-L-methionin-isopropylester erscheint als Nebenreaktion möglich, ist aber nicht streng bewiesen worden. Der genannte Dipeptidester wird sehr rasch zu Methionin abgebaut⁹⁾.

Experimenteller Teil.

1. Substrate und Fermentpräparate. — L-Methionin: Der Firma *F. Hoffmann-La Roche & Co. AG*, Basel, danken wir bestens für die freundliche Überlassung dieser Aminosäure.

L-Methionin-isopropylester: Das Hydrochlorid wird nach¹⁰⁾ erhalten und nach⁷⁾ in den freien Ester übergeführt.

L-Methionyl-L-methionin wurde nach¹¹⁾ hergestellt.

Leberhomogenat: Frische Leber von Ratten¹²⁾ oder Schweinen wurde wie früher⁷⁾ im Verhältnis 1:5 oder je nach Bedarf 1:2,5 mit Wasser homogenisiert. Homogenate 1:2,5 wurden jedoch nicht filtriert, sondern durch kurzes Zentrifugieren geklärt.

Gewinnung einer Dipeptidase-Fraktion aus Schweineleber: 600 g Schweineleber werden innert 2 Std. nach dem Schlachten des Tieres mit 600 ml Wasser und 600 g Eis in einem Turmix zerkleinert. Der Brei besitzt nach Zusatz von 180 ml pH 5-Citratpuffer¹³⁾ ein pH von 6. Er wird unter starkem Rühren und Kühlen auf -10°

⁷⁾ M. Brenner, H. R. Müller & Eva Lichtenberg, *Helv.* **35**, 217 (1952).

⁸⁾ M. Brenner & H. R. Müller, *Helv. physiol. Acta* **9**, C 20 (1951).

⁹⁾ Diss. H. R. Müller, Basel 1950.

¹⁰⁾ M. Brenner, H. R. Müller & R. W. Pfister, *Helv.* **33**, 568 (1950).

¹¹⁾ M. Brenner & R. W. Pfister, *Helv.* **34**, 2085 (1951).

¹²⁾ Wir danken Herrn Prof. Dr. K. Bernhard, Physiol.-chem. Institut der Universität Basel, für die freundliche Überlassung des Tiermaterials.

¹³⁾ 15 ml 0,2-n. NaOH + 85 ml 0,2-m. Dinatriumcitrat.

innert 2 Std. mit 2000 ml Aceton versetzt. Man zentrifugiert im Kühlraum 10 Min. bei 2500 U/min, verwirft das Überstehende, digeriert mit 900 ml Eiswasser, zentrifugiert 1 Std., dekantiert die überstehende, noch trübe Lösung (1. Extrakt), digeriert den Rückstand noch zweimal mit je 300 ml Eiswasser, zentrifugiert beide Male, verwirft den Rückstand und vereinigt die resultierenden Lösungen mit dem 1. Extrakt. Man erhält total 2000 ml Extrakt. Hiermit wird die beschriebene Operation noch viermal mit den folgenden Mengenverhältnissen wiederholt:

Fällungs- operation	Anfangs- volumen	Puffer	Aceton	Wasserextrakt			Endvolumen
				1	2	3	
Nr. 2	2000 ml	24,5 ml	2100 ml	300	250	200 ml	1200 ml trüb
Nr. 3	1200	50	2400	300	200	200	900 schw. trüb
Nr. 4	900	25	900	200	200	100	550 schw. trüb
Nr. 5	550	10	600	100	80	60	280 fast klar

Das Endvolumen der 5. Fällungsoperation (280 ml) hinterlässt nach Gefriertrocknung 17 g eines voluminösen Pulvers, das bei 4° in 400 ml halbgesättigte Ammonsulfatlösung eingetragen wird. Man zentrifugiert im Kühlraum, extrahiert die ungelösten Anteile noch zweimal mit je 200 ml halbgesättigter Ammonsulfatlösung, verwirft den Rückstand und dialysiert die vereinigten Ammonsulfat-Extrakte zunächst gegen fließendes Wasser, dann gegen eiskaltes destilliertes Wasser, zentrifugiert, filtriert das Überstehende klar und lyophilisiert. Es hinterbleiben 5 g eines ziemlich beschränkt haltbaren Präparates: seine Dipeptidase-Aktivität fiel beim Aufbewahren im Kühlschrank innert 6 Monaten auf 1/10 des ursprünglichen Wertes. Bei allen Fraktionen erfolgte jeweils eine Kontrolle auf Dipeptidase-Aktivität, indem man die Freisetzung von Methionin aus Methionylmethionin papierchromatographisch qualitativ überprüfte. Auf eine quantitative Bestimmung der Ferment-Ausbeute wurde verzichtet.

2. Papierchromatographie. Für den qualitativen und halbquantitativen¹⁴⁾ Nachweis von Methionin und Methionylmethionin bedienten wir uns der früher beschriebenen Technik (*Whatman*-Papier Nr. 1, Collidin-Wasser oder *n*-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5⁷⁾¹⁰⁾).

Von den beschriebenen einfacheren Methoden zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren auf Papierchromatogrammen erschien uns zur quantitativen Bestimmung von Methionylmethionin das Verfahren von *Bode* und Mitarb.⁶⁾ besonders geeignet. Es ist auf folgende Weise unseren speziellen Verhältnissen angepasst worden:

Waschen des Papiers: Eine Wanne aus Glas, die mindestens das Format 30 × 50 cm haben soll, wird mit 3 l 0,1-n. NaOH gefüllt. 10 bis 15 Bogen *Whatman*-Papier Nr. 1 46,5 × 28,5 cm werden eines nach dem andern in die Lauge eingelegt und 2 Std. darin belassen, wobei die Flüssigkeit von Zeit zu Zeit etwas bewegt werden soll. Das Ausgießen der Lauge bietet keine Schwierigkeit, da die Papiere am Boden der Wanne kleben bleiben und dabei keinen Schaden nehmen. Die Papiere werden noch zweimal je 4 Std. mit je 3 l destilliertem Wasser behandelt. Das zweite Waschwasser, das vollständig neutral ist, wird nicht mehr ausgegossen. Das Herausnehmen der Papiere aus dem Wasserbad hat sehr sorgfältig zu geschehen, da die nassen Bogen sehr leicht zerreißen. Es empfiehlt sich, die gewaschenen Papiere bei Zimmertemperatur aufzuhängen und zu trocknen. Die Bogen bekommen dadurch viel eher ein glattes Aussehen als beim Trocknen im Heizofen. — Beladung der Chromatogramme: Um ein sauberes Aussehen der Flecken zu erhalten, darf die Beladung 100 µg nicht übersteigen. Ausserdem sollen die Proben in Abständen von mindestens 4 cm auf das Papier gebracht werden. Zum Abmessen der Versuchslösung ist

¹⁴⁾ Visueller Vergleich von Fleckengrößen und -intensitäten.

es unbedingt notwendig, eine Mikrobürette, wie sie *Erlenmeyer* und Mitarb.¹⁵⁾ beschrieben haben, oder einen gleichwertigen Apparat zu verwenden. Vergleichende Versuche über die zulässige Tropfengrösse haben ergeben, dass bei Verwendung der erwähnten Mikrobürette die Grösse des Tropfens 0,005 ml nicht übersteigen soll. Um ein Volumen von 0,01 ml auf das Papier zu bringen, müssen zweimal 0,005 ml direkt hintereinander ohne zu trocknen auf die gleiche Stelle gebracht werden. — Alle Chromatogramme werden aufsteigend im System Collidin/Wasser entwickelt. Das Entfernen des Lösungsmittels geschieht in einem elektrischen Ofen während einer Stunde bei 80 bis 90°. — Bildung der Farbflecken: Es ist sehr wichtig, die Reagentien gleichmässig auf das Papier zu bringen. Um das befeuchtete Papier richtig erkennen zu können, ist eine geeignete Beleuchtung notwendig. Das Besprühen der Chromatogramme mit Reagenslösung geschieht jeweils von beiden Seiten. Ein Überschuss ist dabei zu vermeiden, da sonst die Gefahr besteht, dass die Flecken auseinanderlaufen. Nach der Behandlung mit der üblichen Ninhydrinlösung wird die Farbe in einem Ofen bei 70 bis 80° während 45 Min. entwickelt. Das Papier wird nun mit dest. Wasser besprüht und wieder im Ofen 15 Min. getrocknet. Anschliessend folgt eine zweite Behandlung mit Ninhydrin wie oben. Zur Entwicklung des haltbaren Kupferkomplexes wird das Papier mit einer Lösung von 1 ml gesättigter wässriger Kupfernitratlösung und 0,2 ml 10-proz. HNO_3 in 100 ml 95-proz. Äthanol besprüht¹⁶⁾. Die blaue Farbe schlägt dabei fast momentan in lachsrot um. — Bestimmung der Farbwerte: Die zur Auswertung bestimmten Flecken werden gleichmässig, d. h. so, dass alle Ausschnitte gleich gross sind, ausgeschnitten, die Ausschnitte zerkleinert und in einem Reagensglas mit 10,0 ml Methanol übergossen. Es empfiehlt sich, zur vollständigen Auflösung der Farbe die Gläser einige Std., am besten über Nacht, verschlossen stehen zu lassen. Als Blindprobe dient ein Ausschnitt, der keinen Flecken enthält. Zur Ermittlung der Farbwerte im Kolorimeter dient eine Serie Reagensgläser mit gleichen optischen Eigenschaften, die nach den Angaben von *Moore & Stein*¹⁷⁾ zusammengestellt worden ist. Die gefärbten Lösungen werden mittels einer Pipette in die Kolorimetergläser übergeführt und die optische Dichte wird bei 510 m μ abgelesen. — Verdünnungsreihen und ihre Auswertung: Auf drei Papierbogen werden jedesmal steigende Mengen Dipeptid aufgetragen. Man chromatographiert, entwickelt die Farbflecken, schneidet aus, eluiert die Farbe und bestimmt die optische Dichte der Farblösung unter jeweiliger Berücksichtigung einer Blindprobe (vgl. oben). Bei der graphischen Auswertung erkennt man einerseits, dass die Extinktionswerte, gegen die Menge des Dipeptids aufgetragen, für jeden einzelnen Papierbogen mit überraschend guter Genauigkeit auf eine Gerade zu liegen kommen und andererseits, dass die den verschiedenen Papierbogen entsprechenden Geraden zueinander parallel verlaufen (Fig. 2). Die Abhängigkeit der Extinktion (E) von der Substanzmenge (P) lässt sich also durch eine Gleichung $E = a + kP$ ausdrücken. Dabei ist die Proportionalitätskonstante k in jedem Versuch gleich gross, wodurch die Gültigkeit des *Lambert-Beer*'schen Gesetzes im Bereich der von uns verwendeten Konzentrationen erwiesen ist. Die additive Konstante a stellt eine für jeden Papierbogen charakteristische Grösse dar und hat die Bedeutung eines in Einheiten der Extinktion ausgedrückten Blindwerts. Er kann positiv oder negativ ausfallen. In der für die quantitative Verfolgung des enzymatischen Abbaus von Methionylmethionin gewählten Versuchsanordnung ist es nicht möglich, sämtliche Analysenproben auf einem Papierbogen unterzubringen. Um nun die Farbwerte auf zwei Bogen B_1 und B_2 miteinander vergleichen zu können, ist es notwendig, eine gleiche Beladung V („Vergleichsbeladung“) wenigstens einmal sowohl auf B_1 als auch auf B_2 aufzutragen. Mit Hilfe so resultierender Vergleichsflecken wird es möglich, die Differenz der Blindwerte von B_2 und B_1 zu bestimmen. Die Farbwerte E_2 von B_2 (Blindwert a_2) lassen sich dann auf Farbwerte E_1 für den Blindwert a_1 reduzieren: $E_2 - (a_2 - a_1) = E_1$. Will man weiter nicht nur Farbwerte vergleichen, sondern Beladungen resp. Konzentrationen

¹⁵⁾ *H. Seiler, E. Sorkin & H. Erlenmeyer, Helv.* **35**, 122 (1952).

¹⁶⁾ *Th. Wieland & K. Kawerau, Nature* **168**, 77 (1951).

¹⁷⁾ *S. Moore & W. H. Stein, J. biol. Chemistry* **176**, 370 (1948).

berechnen, so wird es nötig, den Blindwert eines Bogens zu bestimmen, d. h. den Bogen mit Hilfe einer genau bekannten Substanzmenge zu eichen.

3. Dipeptidase-Wirkung. — Qualitative Versuche: Mischungen von je 12 mg L-Methionyl-L-methionin und 3,6 ml frischem Leberhomogenat werden durch Zusatz von je 0,4 ml Wasser bzw. 0,4 ml Carbonatpuffer (Na-Hydrogencarbonat 1-m. bzw. Na-Carbonat 1-m./Na-Hydrogencarbonat 1-m. 1:3 bzw. Na-Carbonat 1-m.) auf ein pH von ca. 6, 7, 8 oder 9 gebracht und bei Zimmertemperatur inkubiert (Peptidkonzentration 0,001-m.). Man unterbricht die Reaktion zu verschiedenen Zeiten durch Zusatz von je 0,8 ml 20-proz. wässriger Trichloressigsäure und analysiert durch Papierchromatographie in Collidin/Wasser.

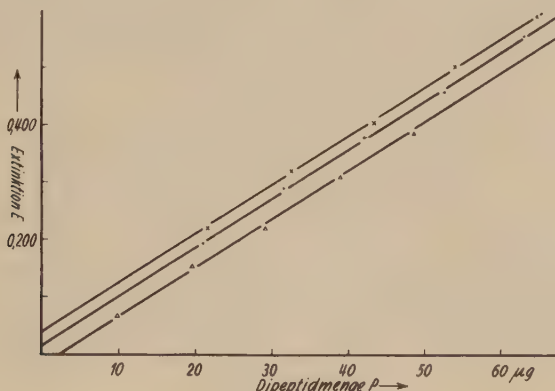


Fig. 2.

Kolorimetrische Auswertung von Papierchromatogrammen.

Zusammenhang zwischen Peptidmenge und Extinktion auf drei verschiedenen Papierbogen.

Bei pH 6 ist nach 30 Sek. alles Peptid verseift; bei pH 7, 8 und 9 verschwindet das Peptid praktisch momentan. D-Methionyl-D-methionin wird unter entsprechenden Bedingungen nicht angegriffen.

Bestimmung des pH-Optimums: Man verfolgt die zeitliche Abnahme von Methionylmethionin (Anfangskonzentration 0,013-m.) in Glycylglycin/Collidin-Puffer bei genau definiertem pH (Tab. 6) und wählt die Fermentkonzentration derart, dass ein Versuch sich über mindestens 5 bis 6 Std. erstreckt. Die jeweilige Ermittlung der Peptidkonzentration erfolgt papierchromatographisch (s. oben) nach Zusatz von Trichloressigsäure zur Unterbrechung der Reaktion.

Beispiel: 15 ml Glycylglycin/Collidin-Gemisch (0,2 Mol Collidin techn.¹⁸) und 0,2 Mol Glycylglycin¹⁹ pro l) werden mit 1-n. NaOH auf pH 8,1 eingestellt. In 6 ml dieses Puffers löst man 24 mg der oben beschriebenen Dipeptidase-Fraktion (Fermentlösung), in 5 ml desselben Puffers 36 mg L-Methionyl-L-methionin. Die in einem Thermostatenbad äquilibrierte Substratlösung wird unter gutem Durchmischen mit 5 ml der Fermentlösung versetzt (pH 7,9, keine Änderung während des Versuches). Nach 0, 15, 30 Min. etc. (siehe unten) werden Proben von je 1 ml entnommen und mit 0,3 ml 20-proz. Trichloressigsäure versetzt (bei höheren Werten müssen, der grossen Pufferkapazität wegen, 0,4 ml Trichloressigsäure verwendet werden). Der voluminöse Niederschlag sedimentiert rasch. Mittels einer Mikrobürette¹⁵) werden Proben von je zweimal 0,01 ml zur Chromatographie nach folgendem Schema auf Papier gebracht:

¹⁸) Teerindustrie Pratteln; pK' = 7,1.

¹⁹) pK₂' = 8,07; H. S. Simms, J. gen. Physiol. 11, 629 (1928).

Bogen 1	Platz	1 } zweimal 0,01 ml der Probe zur Zeit 0 Min.
		2 }
		3 } zweimal 0,01 ml der Probe zur Zeit 15 Min.
		4 }
		5 } zweimal 0,01 ml der Probe zur Zeit 30 Min.
		6 }
		7 } zweimal 0,01 ml der Probe zur Zeit 1 Std.
		8 }
		9 } zweimal 0,01 ml der Probe zur Zeit 1,5 Std.
		10 }
Bogen 2	Platz	1 } zweimal 0,01 ml der Probe zur Zeit 1,5 Std.
		2 }
		3 } zweimal 0,01 ml der Probe zur Zeit 2 Std.
		4 }
		5 } zweimal 0,01 ml der Probe zur Zeit 2,5 Std.
		6 }
		7 } zweimal 0,01 ml der Probe zur Zeit 3 Std.
		8 }
		9 } zweimal 0,01 ml der Probe zur Zeit 3,5 Std.
		10 }

Die Plätze 9/10 auf dem ersten Bogen und 1/2 auf dem zweiten Bogen erhalten zwecks Reduktion der Extinktionen auf den gleichen Blindwert dieselben Beladungen (vgl. „Papierchromatographie“). Tab. 5 zeigt die reduzierten Extinktionen nach den angegebenen Reaktionszeiten.

Tabelle 5.

Reaktionsdauer in Std.	Extinktion E	
	Einzelmessungen	Mittel
0	0,475 }	0,480
	0,485 }	
0,25	0,476 }	0,472
	0,468 }	
0,5	0,440 }	0,438
	0,436 }	
1,0	0,402 }	0,402
	0,402 }	
1,5	0,344 }	0,350
	0,356 }	
2,0	0,296 }	0,298
	0,300 }	
2,5	0,261 }	0,262
	0,263 }	
3,0	0,237 }	0,234
	0,231 }	
3,5	0,184 }	0,182
	0,180 }	

Die graphische Aufzeichnung von E_{Mittel} gegen die Zeit gibt eine Gerade. Es ist $-\Delta E/\Delta t = K'$, wobei K' eine positive Konstante bedeutet. Die Reaktion ist also nullter Ordnung, denn aus $E = a + k \cdot P$ folgt

$$-\Delta E/\Delta t = -k \cdot \Delta P/\Delta t \quad \text{bzw.} \quad -k \cdot \Delta P/\Delta t = K'.$$

Die zeitliche Abnahme der Peptidkonzentration ist konzentrationsunabhängig. Die Geschwindigkeitskonstante nullter Ordnung besitzt den Wert K'/k . An ihrer Stelle bestimmen wir einfachheitshalber die Konstante $K' = -\Delta E/\Delta t$. K' ist also eine der Geschwindigkeitskonstante nullter Ordnung proportionale Grösse; sie charakterisiert die Reaktionsgeschwindigkeit unter den im Versuch herrschenden Reaktionsbedingungen (pH, Fermentkonzentration). Zu ihrer Ermittlung aus den experimentellen Werten der Tab. 5 bedienen wir uns der "Method of Averages"²⁰⁾. Gefunden (pH 7,9): $K' = 0,0885 \text{ Std.}^{-1}$ ²¹⁾.

K' ist bei gegebenem pH der Fermentkonzentration proportional. Bei gegebener Fermentkonzentration und wechselndem pH ist sie ein Mass für die relative Ferment-Aktivität. Tab. 6 gibt 2 Serien von K' -Werten, die nach dem angegebenen Verfahren mit 2 verschiedenen Fermentpräparaten bestimmt worden sind (graphische Darstellung von Serie 1 siehe S. 941). Die pH-Abhängigkeit der Ferment-Aktivität zeigt bei beiden Serien denselben Verlauf.

Tabelle 6.

1. Serie		2. Serie	
Versuchs-pH	$K' \cdot 10^2$	Versuchs-pH	$K' \cdot 10^2$
6,0	0,75	6,5	0,37
6,35	1,85	7,0	3,30
7,0	10,00	7,3	6,65
7,35	12,50	7,5	7,75
8,1	12,20	7,7	7,35
8,3	11,80	8,0	6,45
9,0	8,30	8,5	4,00
10,0	1,35		
10,7	0,00		

4. Nachweis der Peptidbildung. — In frischem Homogenat: Mischungen von 1,5 ml Homogenat 1:2,5 (Ratte), 2 ml pH-7,6-Glycylglycin/Collidin-Puffer 0,2-m. und 100 mg L-Methionin werden mit 1-n. HCl oder 1-n. NaOH auf pH 6, 7, 8 oder 9 eingestellt (Glaselektrode) und anschliessend mit Wasser auf gleiche Volumina ergänzt (Methioninkonzentration ca. 0,17-m.). Man setzt nach $\frac{1}{4}$ - bzw. 3- bzw. 24-stündigem Verweilen bei 20° pro ml Lösung 0,3 ml 20-proz. Trichloressigsäure zu, filtriert und chromatographiert auf Papier (Beladung 0,02 ml Lösung entspr. 500 μg Methionin; Collidin/Wasser). Als Kontrollen dienen entsprechende Mischungen, bei denen der Trichloressigsäure-Zusatz vor der Methionin-Zugabe erfolgt. Zur schätzungsweisen Ermittlung der Peptidausbeute chromatographiert man Proben der eben beschriebenen Kontrollösungen nach Zugabe von steigenden Mengen Methionylmethionin. Die Chromatogramme der Kontrollen und jene der Versuche bei pH 6 und 7 zeigen kein Dipeptid an; bei pH 8 und 9 ist der Peptidfleck deutlich bzw. sehr deutlich sichtbar (vgl. Tab. 4). Kurze und lange Inkubation führen zum selben, beliebig reproduzierbaren Ergebnis.

Versetzt man eine nachgewiesenermassen peptidfreie Homogenat/Methionin-Mischung von pH 6 oder 7 mit 1-n. NaOH bis zu pH 8 oder 9, so entsteht Dipeptid, das nunmehr (Trichloressigsäure-Zusatz!) im Papierchromatogramm auftritt. Versetzt man

²⁰⁾ Farrington Daniels, Mathematical Preparation for Physical Chemistry, New York 1928.

²¹⁾ Dieser Wert ist mit den Werten der Tab. 6 nicht vergleichbar, weil mit einem anderen Fermentpräparat gearbeitet worden ist.

dagegen die peptidfreie Lösung von pH 6 oder 7 mit soviel synthetischem L-Methionyl-L-methionin als im Homogenat/Methionin-Gemisch von pH 9 enthalten ist, so findet vollständiger Abbau statt: das Papierchromatogramm der trichloressigsäuren Lösung lässt kein Dipeptid erkennen.

Die Gleichgewichtseinstellung durch die Dipeptidase erfolgt sehr rasch. Bringt man z. B. ein Homogenat/Methionin-Gemisch ohne vorherigen Zusatz von Trichloressigsäure auf das Papier, so findet man bei anschliessender Chromatographie rund 10 bis 20mal grössere Peptidmengen. Dieses Ergebnis ändert sich nicht, wenn man die auf dem Papier eingetrocknete Probe vor dem Chromatographieren mit einer entsprechenden Menge Trichloressigsäure behandelt. Daraus folgt, dass die beobachteten grossen Peptidmengen während der kurzen Trocknungszeit der Lösung auf dem Papier entstanden sein müssen.

In Gegenwart der Dipeptidase-Fraktion: Anstelle des Rattenleber-Homogenates in den oben angegebenen Vorschriften tritt ein entsprechendes Volumen wässriger Lösung der lyophilisierten Dipeptidase-Fraktion aus Schweineleber. Die Konzentration dieser Lösung hat sich nach der Aktivität des Präparates zu richten; sie betrug z. B. 50 mg/ml. Im übrigen ändert sich am beschriebenen Vorgehen nichts. Die Resultate sind qualitativ und quantitativ mit jenen aus den Homogenat-Versuchen vergleichbar.

Identifizierung und Isolierung von Methionylmethionin: Die Identifizierung des Peptidfleckens erfolgte durch Streifenextraktion, Chromatographie des Extraktes in verschiedenen Lösungsmittelsystemen (Rf-Werte identisch mit jenen von Methionylmethionin) und schliessliche Hydrolyse des Extraktes zu Methionin.

Zur präparativen Isolierung wurde nach folgender Vorschrift verfahren: Man verührt 3,4 g fein pulverisiertes L-Methionin mit 126 ml Homogenat 1:5 (Ratte) und 14 ml Carbonatpuffer (Na-Carbonat 1-m./Na-Hydrogencarbonat 1-m. 1:3) und lässt im Vakuumexsikkator über konz. Schwefelsäure und festem Kaliumhydroxyd eintrocknen (24 bis 48 Std.). Die resultierende Kruste (10 g) wird pulverisiert und in 5 Portionen mit insgesamt 220 ml Collidin extrahiert (verreiben und filtrieren). Der Extrakt wird in zwei Malen auf einer Säule von 600 g Cellulose-Pulver mit wassergesättigtem Collidin als mobiler Phase chromatographiert. Man vereinigt die Methionin-freien Peptidfraktionen, verdampft das Collidin, verdampft noch zweimal nach Zusatz von je 50 ml Wasser zur Trockne, nimmt in 30 ml Wasser auf, versetzt mit 10 ml 20-proz. Trichloressigsäure, filtriert und engt das Filtrat auf 15 ml ein. Die klare Lösung wird in 5 Scheidetrichtern mit je 30 ml Essigester extrahiert, wobei die Scheidetrichter 2 bis 5 noch je 1 g Trichloressigsäure enthalten. Die Essigester-Lösungen 1 bis 4 enthalten das Peptid. Man verdampft zur Trockne, nimmt den Rückstand in Wasser auf und filtriert zur Entfernung der Trichloressigsäure über eine Säule von 50 g Amberlite IR-4B. Das Filtrat hinterlässt nach Eindampfen 400 mg öligen Rückstand. Nach Zusatz von 400 mg 1-Nitronaphtalin-5-sulfonsäure in 7 ml Wasser wird 10 Min. bei 80° mit 200 mg Entfärbungskohle behandelt, filtriert und zur Trockne verdampft. Der kristalline Rückstand gibt beim Umkristallisieren aus 1,5 ml 0,5-n. HCl 320 mg praktisch reines Dipeptid-sulfonat. Eine Probe wird zur Analyse zweimal aus 0,5-n. HCl kristallisiert (Smp. 100—102°) und 8 Std. bei Zimmertemperatur im Hochvakuum getrocknet. Misch-Smp. mit einem authentischen Präparat ohne Depression.

$C_{20}H_{27}O_3N_3S_3, H_2O$	Ber. C 43,55	H 5,30	N 7,62%
(551,64)	Gef. ,, 43,75	,, 5,35	,, 7,36%

Die Hauptmenge liefert nach einem früher beschriebenen Verfahren¹⁰⁾ nach Smp., Misch-Smp., Drehung und Papierchromatogramm reines L-Methionyl-L-methionin. $[\alpha]_D^{18} = +25,70 \pm 1^0$ (c = 2 in Wasser), [synth. Produkt: $[\alpha]_D^{19} = +26,90 \pm 1^0$].

$C_{10}H_{20}O_3N_2S_2$	Ber. C 42,83	H 7,19	N 9,99%
(280,40)	Gef. ,, 42,84	,, 7,05	,, 9,76%

Bereitung der Cellulose-Säule²²): 600 g Solca-Floc BW-100²³) werden zweimal mit 2,5 l dest. Wasser und zweimal mit 2 l Aceton gewaschen. Man suspendiert in 2,5 l Aceton und giesst vorsichtig in eine Säule von 7,5 cm Durchmesser und 60 cm Länge mit eingeschlitzter Glasfritte P2. Nach erfolgter Sedimentation wird das Aceton mit 3 l wassergesättigtem Collidin verdrängt (60 bis 90 ml pro Std.). Man bringt nun eine möglichst konzentrierte Lösung von 4,5 g 8-Hydroxychinolin in wasserfreiem Collidin auf die Säule und wäscht weiter mit wassergesättigtem Collidin bis die oberste farbige Zone sich unterhalb der Säulenmitte befindet (Entfernung der Schwermetallionen).

5. Bestimmung der pK' -Werte von Methionylmethionin. 701 mg L-Methionyl-L-methionin (2,5 mMol) wurden in 5 ml Wasser und 2,50 ml 1,00-n. HCl gelöst. Die Titration erfolgte mit 1,00-n. NaOH unter Verwendung eines *Metrohm*-pH-Meters Typ E 150 A mit Glaselektrode. Gefunden: $pK'_1 = 3,15$ und $3,25$; Mittel $3,20$; $pK'_2 = 7,51$ und $7,54$; Mittel $7,53$.

Eine analog durchgeführte Kontrollbestimmung der pK' -Werte von Methionin ergab eine gute Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur²⁴).

Zur Durchführung dieser Arbeiten standen uns Mittel aus den Arbeitsbeschäftigungskrediten des Bundes zur Verfügung, für die wir auch an dieser Stelle unseren besten Dank aussprechen.

Zusammenfassung.

Methionylmethionin ist ein relativ saures Dipeptid; $pK'_1 = 3,20$, $pK'_2 = 7,53$, $pI' = 5,36$. Dies hat zur Folge, dass das thermodynamische Gleichgewicht zwischen Methionylmethionin und Methionin durch pH-Verschiebungen stärker beeinflusst wird als z. B. das Gleichgewicht im System Alanyl-glycin/Alanin + Glycin. In Gegenwart einer Dipeptidase aus Ratten- oder Schweineleber gelingt es, in einer 0,17-m. Lösung von L-Methionin durch bloße Verschiebung des pH zwischen 7 und 8 eine papierchromatographisch nachweisbare Synthese oder Hydrolyse von L-Methionyl-L-methionin zu bewirken. Das Peptid ist auch präparativ gefasst und identifiziert worden. Der Aktivitätsbereich der Dipeptidase aus Schweineleber liegt zwischen pH 6,5 und 9,5 mit einem Optimum bei pH 7,5. Die Hydrolyse von L-Methionyl-L-methionin erfolgt im untersuchten Konzentrationsbereich nach der nullten Ordnung. D-Methionyl-D-methionin wird durch die Dipeptidase nicht angegriffen.

Zur quantitativen Verfolgung der Dipeptidspaltung diente ein genau beschriebenes papierchromatographisches Verfahren, welches gut reproduzierbare Werte liefert.

²²) Wir verdanken diese Vorschrift Herrn Dr. S. Moore, The Rockefeller Institute for Medical Research, New York.

²³) Produkt der *Brown Company, Foreign Sales Div.*, 150 Causeway Street, Boston 14 (Mass.); erhältlich bei der Fa. *Th. Christ & Co.*, Engelgasse, Basel.

²⁴) O. H. Emerson, P. L. Kirk & C. L. A. Schmidt, J. biol. Chemistry **92**, 449 (1931).

Curriculum vitae

Als Sohn des Adolf Vetterli, Kaufmann, in Basel, und der Pauline, geb. Supper, wurde ich, *Paul Adolf Vetterli* aus Wagenhausen (Thurgau), am 1. August 1926 in Basel geboren. Mein Vater starb am 5. August 1944 in Basel. Ich besuchte Primarschule und Realgymnasium in Basel und erwarb das Reifezeugnis im Frühjahr 1945.

Im April 1945 immatrikulierte ich mich an der Universität Basel und studierte Chemie als Hauptfach, Botanik, Physik und Physikalische Chemie als Nebenfächer. Ich besuchte die Kurse und Vorlesungen der folgenden Dozenten:

Prof. Dr. M. Brenner, Prof. Dr. P. Buchner, Prof. Dr. H. Dahn, Prof. Dr. H. Erlenmeyer, Prof. Dr. M. Geiger-Huber, Prof. Dr. C. A. Grob, Prof. Dr. P. Huber, Prof. Dr. H. Kuhn, Prof. Dr. W. Kuhn, Prof. Dr. E. Miescher, Prof. Dr. H. Mohler, Prof. Dr. T. Reichstein, Prof. Dr. E. Schlittler, Prof. Dr. G. Senn†, Prof. Dr. W. Vischer, Prof. Dr. R. Wizinger.

Im August 1947 bestand ich das Vorexamen in anorganischer Chemie, am 25. September 1950 dasjenige in organischer Chemie. Die Nebenfachexamina wurden erledigt: Botanik am 5. Juni 1948, Physik am 8. Dezember 1950 und Physikalische Chemie am 15. Januar 1953.

Unter der Leitung von Prof. Dr. M. Brenner arbeitete ich vom Januar 1951 bis zum Juli 1954 an der vorliegenden Dissertation.

Seit dem 1. Oktober 1953 betätige ich mich als Unterrichtsassistent (Analytischer Kurs) an der Organisch-chemischen Anstalt der Universität Basel (Vorsteher: Prof. Dr. T. Reichstein).

